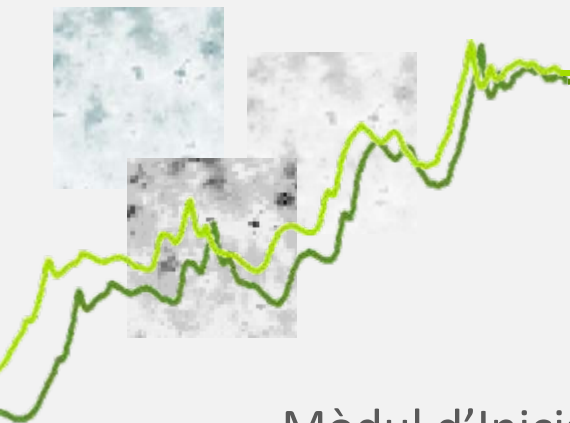


# Estudi de la distribució de components i recobriment en comprimits farmacèutics mitjançant NIR-CI



**Màster Oficial en Ciència i  
Tecnologia Químiques (CITEQ)**

Mòdul d'Iniciació a la recerca i treball fi de màster

**ANNA PALOU GARCIA**

Dr. Marcelo Blanco Romía  
Dr. Manel Alcalà Bernàrdez

**Departament de Química de la UAB  
Facultat de Ciències**

Bellaterra, 1 de setembre de 2011

*Memòria presentada per superar el mòdul d'Iniciació a la Recerca i treball fi de màster corresponent al Màster Universitari en Ciència i Tecnologia Químiques.*

Anna Palou Garcia

*Vist i plau*

Dr. Marcelo Blanco Romía

Dr. Manel Alcalà Bernàrdez

*Bellaterra, 1 de setembre de 2011*

## **AGRAÏMENTS**

Aquest treball s'ha realitzat gràcies a les següents ajudes institucionals:

### **Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid.**

Projecte: "DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGIAS ESPECTRALES PARA EL CONTROL ANALITICO DE PRODUCTOS Y PROCESOS " (CTQ2009-08312).

### **Grup de Quimiometria Aplicada**

Unitat de Química Analítica

Departament de Química

Universitat Autònoma de Barcelona

Edifici Cn, 08193 Bellaterra

I les següents ajudes privades:

### **Esteve Farma,**

C/ Sant Martí, s/n.

08107 Martorelles,

Barcelona. Spain

*Però no són només les ajudes institucionals les que possibiliten tot aquest treball, sinó que al darrera sempre hi ha un gran nombre de persones que posen el seu granet de sorra, perquè aquest sigui possible.*

*En primer lloc, agrair la confiança del Dr Marcelo Blanco, que em va donar la oportunitat d'entrar al grup de Quimiometria Aplicada, tot i venir d'un camp completament diferent. I agrair també l'ajuda inestimable del Dr Manel Alcalà i la resta de membres docents del grup.*

*Donar les gràcies als companys de laboratori (David, Juan i Sergio) que han estat amb mi en el dia a dia: per la paciència, pels bon moments i, evidentment, per l'ajuda tècnica, que sempre és benvinguda. Gràcies al Dani per la crítica sincera i els consells d'ofimàtica. Gràcies especialment al Jordi Cruz, sense els consells i l'ajuda del qual, no seria avui aquí, ni de bon tros.*

*Gràcies als meus pares pel seu suport incansable... Gràcies a tots els que m'han fet costat en els moments durs, a tots els que están allà en el moment just i el lloc oportú, impossibles d'enumerar, però totalment indispensables...*

*Gràcies a tots,*

*Anna*

## RESUM

La qualitat d'un producte elaborat és un factor important, tant pels consumidors, com pels òrgans reguladors que en defineixen normatives cada cop més estrictes. Iniciatives com la del PAT (*Process Analytical Technology*) en el sector farmacèutic, responen a aquestes necessitats. El PAT afavoreix la implantació de noves tècniques analítiques que facilitin el monitoratge i el control de paràmetres clau *in-/on-line* durant els processos de producció. En aquest sentit, el NIR-CI (*Near Infrared-Chemical Imaging*) podria ser una eina molt útil en la millora de la qualitat de la indústria farmacèutica, ja que aprofita les avantatges del NIR com a tècnica analítica (ràpid, no invasiu, no destructiu) i les aplica a tota la superfície espacial de la mostra. És una tècnica capaç de proporcionar una gran quantitat d'informació, tant espectral com espacial, en una sola imatge.

L'objectiu d'aquest treball és avaluar la capacitat de la tècnica NIR-CI, com a eina pel control de paràmetres de qualitat de comprimits farmacèutics. Concretament, s'han analitzat quantitativament la concentració i la distribució dels components (principi actiu i excipients) d'un comprimit farmacèutic amb i sense recobriment. A més, també s'ha determinat el gruix de la pel·lícula de laca de recobriment i la seva distribució a la superfície del comprimit.

Per obtenir aquesta informació, es parteix d'imatges NIR-CI hiperespectrals dels comprimits. Per a l'extracció de les dades d'interès s'ha usat l'algoritme PLS en les diferents versions dels *softwares* Isys 5.0 i Unscrambler 9.8. La versió de l'Isys permet determinar la contribució de cada component pur a cada punt de la imatge, emprant únicament l'espectre del component en estudi. Amb la de l'Unscrambler, en canvi, es construeix un model de calibratge que, a partir d'unes mostres de referència, prediu la distribució del gruix de recobriment sobre la superfície del comprimit.

# ÍNDIX

<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aplicació de la Tecnologia Analítica de Processos (PAT).....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Espectroscòpia NIR-CI.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Fonaments de l'espectroscòpia NIR.....	2
1.2.2 El NIR en imatge (NIR-CI).....	4
1.2.3 Aplicació del NIR-CI a la indústria farmacèutica.....	6
<b>1.3 Quimiometria.....</b>	<b>7</b>
1.3.1 La imatge hiperespectral.....	7
1.3.2 Pretractament espectral.....	9
1.3.3 Anàlisi quantitatiu de la imatge.....	10
<b>2. OBJECTIUS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. PART EXPERIMENTAL.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Característiques de les mostres.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Instrumentació.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Adquisició de les imatges.....</b>	<b>14</b>
3.3.1 Procediment de registre.....	14
3.3.2 Imatges registrades.....	15
<b>3.4 Tractament de les dades.....</b>	<b>16</b>
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Quantificació d'API i excipients.....</b>	<b>21</b>
4.1.1 Nuclis.....	21
4.1.2 Comprimits lacats.....	24
<b>4.2 Quantificació del recobriment.....</b>	<b>25</b>
<b>5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>30</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>31</b>

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1 Aplicació de la Tecnologia Analítica de Processos (PAT)

Cada cop és més comú l'ús de tècniques i mètodes pel monitoratge i el control de processos de producció en la indústria. L'objectiu segueix sent la millora dels processos de producció, però ha canviat l'estratègia per aconseguir-lo. No n'hi ha prou amb una visió basada únicament en l'anàlisi de la qualitat del producte final, sinó que es busca l'enteniment dels processos pas a pas. Tot això és d'especial importància en la indústria farmacèutica, un sector poc innovador pel que fa als processos de manufactura, degut a les estrictes regulacions a què es troba sotmès.

Per aconseguir aquesta fita, la *Food and Drug Administration* (FDA), l'agència nordamericana encarregada de regular tota la recerca i producció de fàrmacs i aliments als USA, ha impulsat la Tecnologia Analítica de Processos (PAT, *Process Analytical Technology*). Es tracta d'una iniciativa que integra disciplines com la química analítica i la química de processos, juntament amb eines quimiomètriques. La FDA la defineix com "un sistema per dissenyar, analitzar i controlar la producció mitjançant la mesura dels paràmetres de qualitat oportuns, tant en les matèries primes, com en els materials en procés d'elaboració, amb l'objectiu d'assegurar la qualitat del producte final" [1]. Això permet mantenir les característiques de seguretat i qualitat esperades en el producte final, però també millora l'eficiència de manufactura, el que es tradueix en una reducció dels costos de producció.

Per assegurar la qualitat del producte final cal identificar aquells paràmetres que tenen més impacte en el procés i desenvolupar mètodes adients per poder-ne fer el seguiment pas a pas i a temps real. Aquest control exhaustiu permet la detecció i correcció pràcticament immediata de qualsevol problema i, a l'hora, facilita la implementació contínua de millores en el procés. Per dur a terme tot aquest seguiment del procés és indispensable disposar d'un bon sistema de presa i anàlisi de mostres que permeti l'extracció de la informació clau en cadascun dels passos. Es requereixen tècniques analítiques ràpides que puguin ser aplicades *on-* o *in-line*<sup>1</sup>, per poder

---

<sup>1</sup> En l'aplicació *in-line* d'una tècnica, la interfície de l'analitzador està directament en contacte amb el procés. En canvi, si l'aplicació es fa de forma *on-line*, caldrà recirculació de la mostra perquè aquesta arribi a l'analitzador. En qualsevol cas, els dos mètodes impliquen una millora respecte dels processos *off-* i

controlar l'avanç del procés a temps real; tècniques que requereixin poca manipulació per tal de millorar la seguretat i disminuir el temps i els errors humans durant l'anàlisi. La resposta a aquestes necessitats és la gradual substitució de tècniques analítiques lentes (cromatografia de gasos i líquids) i tècniques de control no específiques (temperatura, pressió, pH...), per mètodes més ràpids, específics i no agressius amb el medi ambient [2].

## 1.2 Espectroscòpia NIR-CI

D'entre totes les tècniques adaptables a les condicions requerides pel PAT destaca l'espectroscòpia molecular en totes les seves vessants: ultravioleta-visible, infraroig (IR, *Infrared*), Raman..., que unida a la fibra òptica permet cada cop una millor integració en el procés. L'IR és sens dubte una de les tècniques més versàtils, ja que permet l'anàlisi de materials en qualsevol dels tres estats: sòlid, líquid i gas. I, més en concret, destaca l'infraroig proper (NIR, *Near Infrared*) ja que requereix un pretractament mínim de la mostra en la majoria dels casos. Així es pot obtenir informació tant química, com física de la mostra sense malmetre-la. La quantitat d'informació aconseguida es multiplica si el que s'utilitza és el NIR en imatge (NIR-CI, *Near Infrared-Chemical Imaging*). En aquest cas, el que s'obté és un espectre NIR per cada píxel d'una imatge registrada. És evident que la quantitat d'informació extreta de la mostra mitjançant NIR-CI és molt superior i el fet que es presenti en forma d'imatge fa que sigui molt més visual, de manera que se'n podran fer estudis molt més acurats.

### 1.2.1 Fonaments de l'espectroscòpia NIR

La part experimental d'aquest treball ha estat realitzada a la regió del NIR. Aquesta regió es troba compresa entre els 780 i els 2500nm, és a dir, entre l'infraroig mitjà (MIR, *Mid Infrared*) i el visible (Figura 1). L'absorció de la radiació NIR és deguda als sobretons i les bandes de combinació de bandes fonamentals de vibració de les molècules. Tant en un cas com en l'altre, es tracta de fenòmens poc probables, de manera que les seves bandes corresponents no són tant intenses com les de les

---

*at-line*, ja que no requereixen extracció de la mostra (no destructius) i els anàlisis es poden fer de forma molt més automatitzada i gairebé a temps real.



bandes fonamentals observades en la zona del MIR, sinó que, solen ser un o dos ordres de magnitud més dèbils [3]. A més, els solapaments entre sobretons i bandes de combinació donen lloc a bandes amples i poc definides. Aquestes característiques restringeixen la sensibilitat i selectivitat del NIR, fet que es compensa amb un tractament quimiomètric adequat de les dades per poder extreure'n la informació d'interès i analitzar-la tan qualitativa, com quantitativament. Però aquest baix coeficient d'absorció suposa una avantatge, ja que permet treballar amb mostres sense diluir.

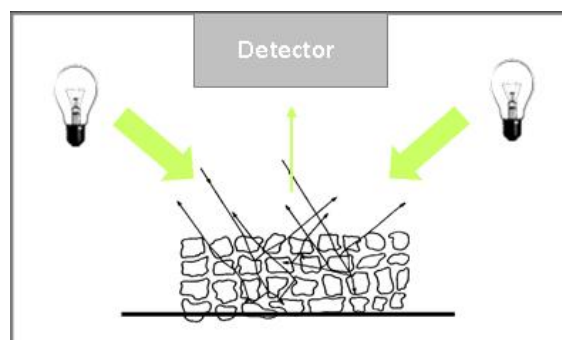
$\lambda$	20	170	400	800	2500	5000	$10^6$	nm
$\nu$	$5 \cdot 10^5$	60000	25000	12500	4000	200	10	$\text{cm}^{-1}$
Raigs X	Ultraviolat llunyà (UV)	Ultraviolat proper (UV)	Visible	Infraroig proper (NIR)	Infraroig mitjà (MIR)	Infraroig llunyà (FIR)	Microones	

**Figura 1.** Espectre electromagnètic, amb la zona NIR destacada en verd.

Perquè hi hagi absorció en la regió NIR cal que una molècula experimenti un canvi net en el seu moment dipolar com a conseqüència del seu moviment de vibració. Si la freqüència de la radiació coincideix amb la freqüència natural de vibració de la molècula, hi haurà una transferència neta d'energia que farà variar l'amplitud del moviment, donant lloc a l'absorció de la radiació. Les bandes més intenses en aquesta regió venen donades per enllaços com: C-H, N-H, O-H i S-H, presents en la majoria de compostos orgànics. És per aquest motiu que l'espectroscòpia NIR, a més de permetre la quantificació dels diferents components d'una mescla (informació química), és sensible a interaccions intermoleculars, com els ponts d'hidrogen, que proporcionen informació física de la mostra. Enllaços com C=O, C-C, C-Cl o C-F s'observen de forma molt més dèbil en aquesta regió i les espècies homonuclears ( $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ...) no hi absorbeixen, ja que el seu moment dipolar no s'altera amb la vibració.

El treball amb NIR sol dur-se a terme en el mode de reflectància difosa, molt útil en el cas de mostres sòlides. La reflectància és la fracció de radiació reflectida per la mostra, de la qual se'n poden distingir dues components: l'especular i la difosa. La primera dóna nom a la radiació que es reflexa amb un angle igual al d'incidència, sense haver penetrat a la mostra, de manera que no conté cap mena d'informació sobre aquesta. La contribució de la reflectància especular sol minimitzar-se amb una posició apropiada dels detectors respecte la mostra. La component difosa, en canvi, és el resultat de l'absorció parcial de la llum i la posterior dispersió en totes direccions [4] (Figura 2), de manera que interacciona amb la mostra, recollint-ne informació a diferents punts i profunditats. La il·luminació de la mostra és un paràmetre molt

rellevant a l'hora d'obtenir imatges de qualitat. Les fonts de llum solen situar-se amb un angle de  $45^\circ$  respecte la mostra, per tal de minimitzar la formació d'ombres. Així, col·locant el detector just sobre la mostra (a  $90^\circ$ ), s'aconsegueix eliminar en gran part la llum de la component especular.



**Figura 2.** Esquema de la trajectòria de la radiació NIR en la mesura per reflectància difosa.

Les principals avantatges que presenta el NIR com a tècnica analítica són [5]:

- És una tècnica no invasiva, ni destructiva
- Permet registrar l'espectre de mostres en estat sòlid, líquid o gasós
- El pretractament de la mostra és mínim o inexistent en la majoria dels casos. Això redueix el temps d'anàlisi, però també l'ús de reactius, fet que abarateix tant el cost, com l'impacte sobre el medi ambient
- Els espectres NIR contenen informació tant química, com física de la mostra
- El registre dels espectres és ràpid i permet obtenir informació de la mostra a temps real
- La fibra òptica permet realitzar els anàlisis en la mateixa cadena de producció (*on-/in-line*)
- El cost dels anàlisis és baix

### 1.2.2 El NIR en imatge (NIR-CI)

El NIR-CI és la fusió de l'espectroscòpia NIR convencional i l'anàlisi per imatge. A continuació, es descriu com s'aprofiten aquests principis per generar imatges, com s'interpreten aquestes imatges i les noves possibilitats que generen en el control analític de processos.

## Principis bàsics del NIR-CI

Una imatge és la representació de l'aparença d'un objecte o una escena real. La característica principal de les imatges és que requereixen algun tipus de contrast per diferenciar les regions d'interès dins d'un camp de visió. El contrast pot estar basat en qualsevol qualitat mesurable de la mostra que es pugui expressar en funció de l'espai. Com més variables es mesurin en cada punt de la imatge (píxel), millor serà el contrast observat. En el cas de les imatges NIR, el contrast s'aconsegueix mitjançant l'espectroscòpia NIR. En la majoria dels casos (mostres sòlides i en pols), el contrast que es mesura és la intensitat de la reflectància difosa [6], descrita anteriorment, que es transforma a absorbància.

Mitjançant l'espectroscòpia NIR convencional s'obté l'espectre promig de la superfície de les mostres analitzades. El NIR-CI permet registrar un espectre NIR per cadascun dels píxels de la imatge adquirida. Així, s'aconsegueix aprofitar les avantatges que té el NIR com a tècnica analítica (apartat 1.2.1) i aplicar-les a tota la superfície de la mostra, obtenint una gran quantitat d'informació, tant espectral com espacial, en una sola imatge.

Les imatges obtingudes es coneixen amb el nom d'imatges químiques perquè d'elles se'n pot extreure informació química: composició, concentració, humitat... Però en el cas del NIR també es pot obtenir informació física de la mostra: estructura, viscositat... D'aquesta manera, es poden estudiar detalladament les diferents propietats químiques i físiques de la mostra al llarg de tota la seva superfície i analitzar-ne la distribució dels components.

## Desenvolupament de la tècnica i instrumentació

El registre d'imatges espectroscòpiques es pot dur a terme de dues formes diferents: per escombrat o mitjançant *Focal Plane Array* (FPA), que és el mètode utilitzat en aquest treball. Cadascuna d'aquestes tècniques presenta característiques específiques, que es reflecteixen en el tipus d'instrumentació usada [6].

L'escombrat consisteix en la mesura seqüencial de regions adjacents d'una mostra, ja siguin punts concrets o línies de punts. Els primers mapes químics es van publicar el 1988 per Harthcock i Atkin [7] i estaven registrats usant un microscopi amb FTIR acoblat a una plataforma mòbil. D'aquesta manera, s'aconseguia el moviment precís i acurat de la mostra sota el feix de llum i, per tant, es cobria tota la superfície

desitjada. Aquest mètode permet l'obtenció d'espectres d'alta resolució, tot i que el procés d'adquisició és força lent i en limita tant el tamany de la superfície a registrar, com la seva aplicació *at/on-line* [8].

Això s'ha solventat amb l'aplicació dels detectors FPA [8], compostos per milers de detectors individuals (píxels). En aquest cas, no es requereix de cap element mòbil, sinó que es registren imatges de tot el pla de la mostra a cadascuna de les longituds d'ona desitjades. És a dir, que el FPA mesura simultàniament la intensitat de l'absorció NIR a cadascun dels píxels de la imatge i ho fa a totes les longituds d'ona desitjades, que es van succeint seqüencialment gràcies a l'aplicació de diferents filtres. La imatge hiperespectral final s'obté de la combinació de les imatges a totes les longituds d'ona registrades [6].

Els instruments NIR-CI FPA comercials disponibles actualment permeten obtenir imatges de 256x320 píxels a resolucions espectrals de fins a 10µm/píxel, amb un temps d'adquisició d'entre 1 i 5 minuts.

### 1.2.3 Aplicació del NIR-CI a la indústria farmacèutica

La rapidesa i la simplicitat amb què el NIR-CI adquireix gran quantitat d'informació d'una mostra, sense malmetre-la, ha despertat l'interès en diferents camps d'estudi: indústria química, alimentària, medicina... entre els quals destaca l'anàlisi de productes farmacèutics. I són justament els productes farmacèutics l'eix central d'aquest treball.

L'increment en l'ús del NIR-CI en el camp farmacèutic, afavorit en gran mesura per les recomanacions del PAT, queda reflectit en la diversitat d'estudis duts a terme en els darrers anys: anàlisis de l'homogeneïtat de mescles en pols [9], determinació del tamany de partícula [10], estudis de composició de fàrmacs [11], determinació de concentració i anàlisis de distribució de components en comprimits sòlids [12], estudis d'uniformitat de contingut [13], anàlisis de comprimits *high-throughput* [14]... Aquests i altres exemples d'aplicacions del NIR-CI en el camp de la indústria farmacèutica es recullen en diverses revisions sobre el tema [3,15].

Un aspecte important en el control de la qualitat de fàrmacs sòlids, és el recobriment. Tot i que existeixen algunes referències que tracten aquest tema [16,17], el seu estudi no és tan ampli com els esmentats anteriorment. Les funcions de la capa de laca que recobreix la majoria de comprimits farmacèutics poden ser tant estètiques,

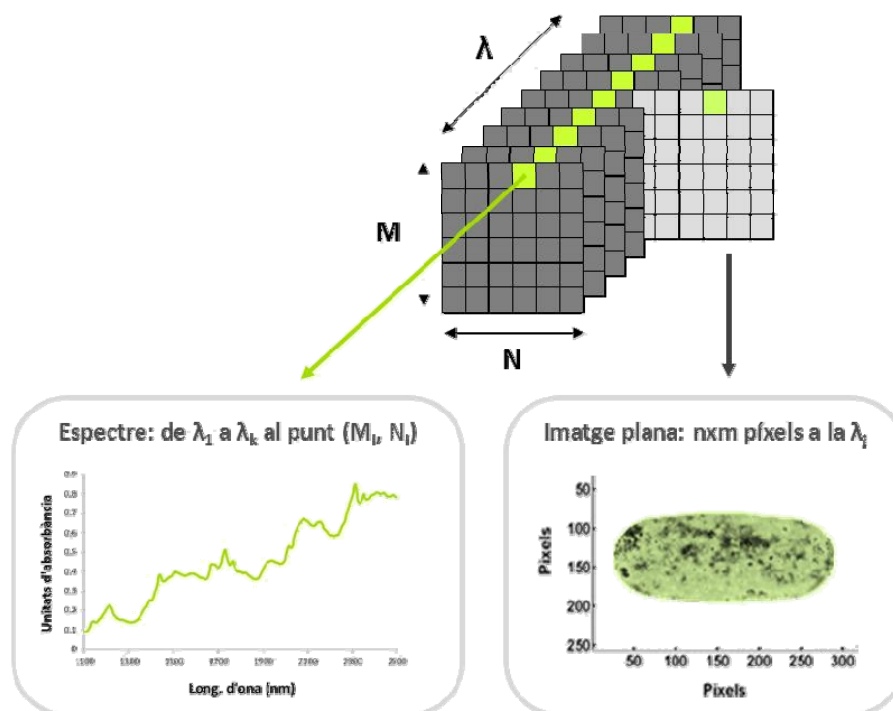
com funcionals. La laca permet emascarar sabors desagradables de l'API (*Active Pharmaceutical Ingredient*) i facilitar la ingesta de la pastilla, així com preservar-ne la unitat i l'aspecte. En el cas dels recobriments funcionals, aquests permeten l'alliberament controlat o entèric de la forma posològica. En qualsevol cas, la funcionalitat del recobriment depèn en gran part del seu gruix i de la seva distribució a la superfície del comprimit: un recobriment massa fi o massa gruixut pot afectar la seva funcionalitat. La determinació del gruix mitjà de laca d'un comprimit no és suficient i és necessari disposar d'informació més detallada sobre la seva distribució en tota la superfície. Així mateix, passa amb la resta de components de la majoria de comprimits farmacèutic: la seva distribució és important per la funcionalitat del producte i és una informació impossible d'aconseguir mitjançant les tècniques de NIR convencional. I és justament en els anàlisis d'homogeneïtat on entra en joc el paper fonamental del NIR-CI en el control de processos de producció de fàrmacs *in-* i *on-line*.

### 1.3 Quimiometria

Si l'avantatge que ofereix el NIR-CI respecte el NIR és la quantitat d'informació de la mostra, la principal dificultat n'és el seu tractament per poder-ne extreure la informació d'interès. En aquest apartat es descriu la manera com s'estructuren les dades d'una imatge hiperespectral i es presenten alguns dels algorismes més utilitzats per tractar-les de forma eficaç.

#### 1.3.1 La imatge hiperespectral

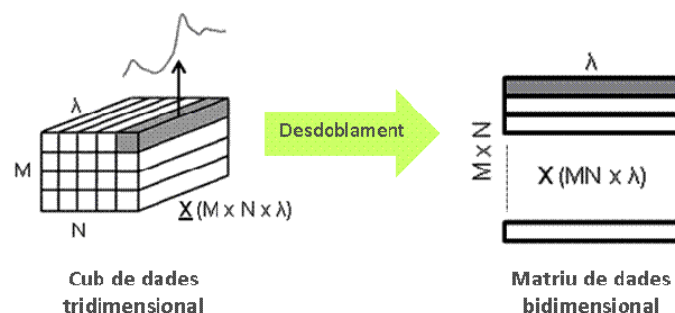
El resultat del NIR-CI és una imatge que es pot concebre com un mapa químic de la mostra, el que s'anomena imatge hiperespectral. Les dades d'aquesta imatge s'ordenen en forma de cub tridimensional de dades  $\underline{X}(M \times N \times \lambda)$ : dos d'aquestes dimensions contenen la informació espacial ( $M \times N$ ), mentre que la tercera ( $\lambda$ ), aporta la informació espectral. Per fer-ho més entenedor, aquest cub de dades es pot considerar de dues maneres (Figura 3):



**Figura 3.** Esquema de l'estructura del cub tridimensional de dades i relació entre les dades espacials i espectrals en una imatge hiperespectral.

- Imatge de  $M \times N$  píxels de cadascun dels quals penja un espectre complet a totes les longituds d'ona registrades.
- Sèries d'imatges planes consecutives, cadascuna registrada a una mateixa longitud d'ona per tots els píxels.

Prèviament a l'aplicació de qualsevol pretractament espectral o de qualsevol algoritme per a l'extracció de la informació és necessari el desdoblament (*unfolding*) del cub de dades hiperespectral. Això es deu al fet que la majoria d'eines quimiomètriques multivariants estan desenvolupades per a matrius de dades *two-way*. El desdoblament no és res més que la reorganització de les dades tridimensionals obtingudes  $\underline{X}(M \times N \times \lambda)$  en una matriu bidimensional  $\underline{X}(M \times N \lambda)$ , on cada fila es correspon a l'espectre d'un píxel de la imatge (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema del procés de desdoblament d'un cub de dades hiperespectral.

### 1.3.2 Pretractament espectral

Els pretractaments són correccions matemàtiques que s'apliquen amb l'objectiu d'augmentar la qualitat de la senyal per tal de facilitar el posterior desenvolupament de mètodes de calibratge més simples i robusts. El que s'aconsegueix és maximitzar la relació senyal/soroll dels espectres a base d'eliminar aquella informació espectral que no és d'origen químic. Aquestes contribucions indesitjades solen ser degudes a la naturalesa de la mostra (tamany de partícula, regularitat de la superfície...), possibles variacions de les condicions de mesura (temperatura, angle...) o al soroll instrumental.

Alguns dels pretractaments més usats són: el promig d'espectres i el suavitzat, dues formes de disminuir el soroll que presenten els espectres; el *Standard Normal Variate* (SNV) i el *Multiplicative Scatter Correction* (MSC), dues aproximacions per corregir intensitats i/o desviacions de la línia de base degudes a l'efecte de dispersió de la llum (*scattering*) en diferents tipus de mostres; i les derivades de Savitzky-Golay, que augmenten la contribució de les bandes més rellevants, augmentant la resolució de les bandes amples i solapades típiques del NIR.

En el present treball el pretractament que s'ha aplicat a les imatges és el SNV, un algoritme que opera individualment sobre cada espectre, centrant-lo a una intensitat mitja de valor zero i desviació estàndard igual a u. Per fer-ho, cada valor d'absorbància  $x_{i,j}$  d'una fila (espectre), es transforma d'acord amb la fórmula:

$$x_{i,j}^{SNV} = \frac{x_{i,j} - \bar{x}_i}{S_i}$$

on  $\bar{x}_i$  és l'absorbància mitja de l'espectre  $i$ , i  $S_i$  n'és la desviació estàndard. El resultat és la correcció de les desviacions de la línia base i l'eliminació dels efectes de

l'*scattering*, deguts principalment a diferències físiques entre mostres, molt habituals en les dades de reflectància difosa.

### 1.3.3 Anàlisi quantitatiu de la imatge

L'anàlisi d'una imatge consisteix en l'aprofitament dels contrastos espectrals entre píxels per convertir-los en informació interpretable [8]. Per dur a terme un anàlisi quantitatiu cal un procés previ de calibratge [3]. El model de calibratge és el conjunt d'equacions que permeten establir una relació entre les dades mesurades i els valors de referència coneguts del paràmetre d'interès. Per generar-lo, doncs, cal disposar de mostres amb valors de referència coneguts. L'objectiu és que el model tingui bona capacitat predictiva, és a dir, que predigui de forma fiable els valors d'aquest paràmetre per noves mostres, de les quals no es disposa de valors de referència.

En aquest treball la resposta instrumental són els espectres: mesures de l'absorbància/reflectància a més d'una variable (longitud d'ona), de manera que el que s'utilitzen són mètodes de calibratge multivariable. Alguns dels algorismes de calibratge multivariants més usats en aquests casos són: el *Principal Component Regression* (PCR), el *Partial Least Squares* (PLS) i el *PLS-Discriminant Analysis* (PLS-DA). També hi ha alternatives per treballar quan no es coneixen els elements de la mescla, com és el cas del *Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares* (MCR-ALS) i la seva versió augmentada. L'elecció de l'algorisme dependrà tant de la informació disponible com del tipus d'informació que se'n vulgui obtenir.

En aquest treball l'algorisme utilitzat és el PLS, un dels algorismes multivariants més utilitzats per l'anàlisi quantitatiu de dades obtingudes per CI. Es tracta d'un mètode de regressió que estableix relacions lineals entre les matrius de dades X (espectres) i Y (valors de referència). Així s'obtenen les variables latents (factors PLS) en X que millor prediran en Y, tenint en compte els dos conjunts de variables [18,19]. La seva aplicació és molt útil en el tractament de grans quantitats de variables x, encara que aquestes siguin sorolloses o estiguin espectralment correlacionades, ja que l'ús de factors permet esquivar aquests efectes. Encara que el PLS no exigeix el coneixement de tots els components de la mescla a analitzar, sí que requereix un conjunt de dades de referència de la propietat a modelar prou gran per poder construir un model de calibratge adequat a les mostres a analitzar [19].



## 2. OBJECTIUS

Tal i com s'ha descrit en la introducció, la tendència actual és la millora contínua del control i l'enteniment dels processos de producció en la indústria. El present treball s'ha dut a terme seguint aquesta premisa i s'ha basat en l'ús del NIR-CI, juntament amb la quimiometria, aplicats específicament al cas de la indústria farmacèutica.

Els objectius generals d'aquest treball són els següents:

- Aconseguir l'extracció de tota la informació rellevant continguda en les imatges hiperespectrals obtingudes mitjançant NIR-CI.
- Aprofitar aquesta informació pel desenvolupament de models de calibratge multivariable per a la determinació de concentració/gruix i distribució dels diferents components de comprimits farmacèutics. Aquests models han de permetre la predicció de noves mostres de característiques similars en el futur.

En aquest estudi es pretèn establir mètodes quantitatius que permetin la determinació de la concentració de principi actiu i excipients, i del gruix de recobriments a partir de les dades obtingudes mitjançant NIR-CI. Aquests mateixos mètodes han de servir per a analitzar la distribució de tots els components (principi actiu, excipients i capa de recobriments) a la superfície del comprimit farmacèutic.

### 3. PART EXPERIMENTAL

En aquest apartat es descriu la metodologia experimental utilitzada durant l'estudi, des de la descripció de les mostres usades en els experiments, fins al tractament quimiomètric de les imatges obtingudes per NIR-CI.

#### 3.1 Característiques de les mostres

Les mostres que s'han fet servir per dur a terme aquest treball són comprimits farmacèutics de forma ovalada i dimensions aproximades de 1x0.4x0.6 cm, i mostres en pols dels diferents components purs que componen els comprimits. Es poden distingir tres tipus de comprimits: (a) nuclis (comprimits sense recobriment), (b) comprimits recoberts amb diferents gruixos de laca i (c) comprimits procedents del procés de producció en la planta pilot, que s'anomenaran en el treball com a comprimits de producció.

El recobriment dels comprimits té lloc dins d'un tambor rotatori que disposa d'una entrada d'aire calent a la part inferior i un pulveritzador a la part central. El gir del tambor permet que la laca que espraia el pulveritzador recobreixi les diferents cares del comprimit. L'entrada d'aire calent té la funció d'assecar aquesta laca, evitant que els comprimits quedin enganxats. El gruix de la pel·lícula de laca final d'un comprimit dependrà directament del temps d'espraiat dins del tambor. Els comprimits recoberts (grup b) inclouen mostres amb gruixos de recobriment aconseguits usant temps entre 0 i 3 vegades el temps de recobriment estàndard usat en el procés de producció (x). Tots aquests comprimits s'anomenaran en funció del temps que hagi durat el seu recobriment respecte x. Així, en el grup b s'inclouen comprimits de 0x, 0.5x, 1x, 2x i 3x.

Per raons de confidencialitat, no es mencionen els noms de l'API ni dels excipients que componen aquests comprimits. Tots els comprimits sense recobrir tenen la mateixa composició, amb valors nominals de concentració del 35% de principi actiu (API) i el 65% restant de la suma d'excipients, dels quals: el 40% és de l'excipient #1, el 20% de l'excipient #2, el 2% de l'excipient #3 i l'1.5% per cadascun dels excipients #4 i #5. És important ressaltar que l'API i els dos excipients majoritaris representen un 95% del total del comprimit. A més, cal tenir en compte que en el cas dels comprimits recoberts l'augment de pes degut a la laca implica una disminució de la concentració d'API i excipients respecte el total. Així, els percentatges dels diferents components

disminueixen lleugerament a mesura que augmenta el gruix del recobriment. La variació pels components majoritaris es recull a la Taula 1.

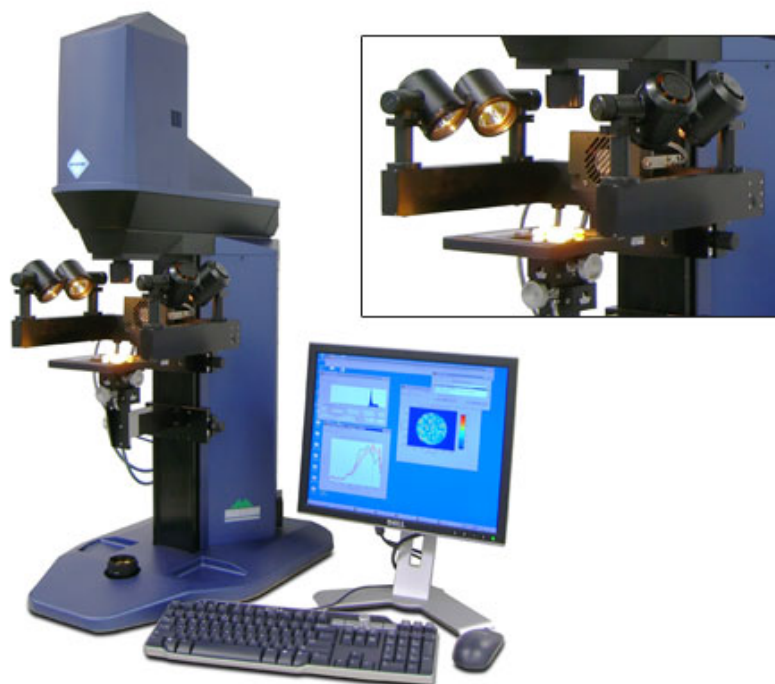
**Taula 1.** Composició (en % m/m) d'API i els dos excipients majoritaris dels comprimits en funció del gruix de recobriment.

Composició de les mostres (% m/m)					
Gruix de recobriment	0x	0.5x	1x	2x	3x
API	35.0	34.4	33.9	33.0	32.0
E #1	40.0	39.3	38.8	37.7	36.6
E #2	20.0	19.7	19.4	18.8	18.3

Les mostres en pols s'han usat per la construcció de les biblioteques necessàries per construir els models PLS amb el programa Isys 5.0. Aquests models s'han aplicat a les mostres dels grups a i b amb l'objectiu de determinar-ne la concentració dels diferents components (API i excipients). A la vegada, les mostres del grup b s'han utilitzat com a conjunts de calibratge i validació dels models PLS generats amb l'Unscrambler 9.8. Aquests models s'han usat per a la determinació del recobriment de les mostres de producció (grup c).

### 3.2 Instrumentació

Per a l'adquisició de les imatges s'ha fet servir la càmera hiperespectral SyNIRgy<sup>TM</sup> Chemical Imaging System de Malvern (Malvern Instruments, Malvern, UK) (Figura 5), equipada amb un detector de tipus InSb FPA de 320x256 píxels i controlada mitjançant el *software* Pixys® 1.1 software (Malvern Instruments, Malvern, UK).



**Figura 5.** Càmera hiperespectral Malvern SyNIRgi.

### 3.3 Adquisició de les imatges

En el cas de les imatges NIR-CI, a més de les característiques tècniques de la càmera, són molt importants els detalls d'il·luminació, enfoc, col·locació de les mostres... A continuació, es recull tot el procés general d'adquisició d'imatges, així com la descripció de les característiques específiques de registre per cadascun dels tipus de mostra analitzats.

#### 3.3.1 Procediment de registre

Les mostres es col·loquen a la platina, s'il·luminen amb les llums halògenes situades al voltant en un angle apropiat ( $45^\circ$  aproximadament) i s'ajusta la distància de l'objectiu segons la grandària de l'objecte. El nombre de píxels d'una imatge d'aquest tipus ve donat pel seu sistema d'*imaging*, però la mida del píxel la defineixen els augments òptics. Així, en les condicions seleccionades, les imatges tenen una resolució espacial de  $40\mu\text{m}$  (cada píxel té una àrea de  $40 \times 40 \mu\text{m}$ ). El temps d'adquisició d'una imatge de reflectància, cobrint un rang de longituds d'ona entre 1200 i 2400 nm i amb una resolució espectral de 10 nm, és d'uns tres minuts. Tot el procés

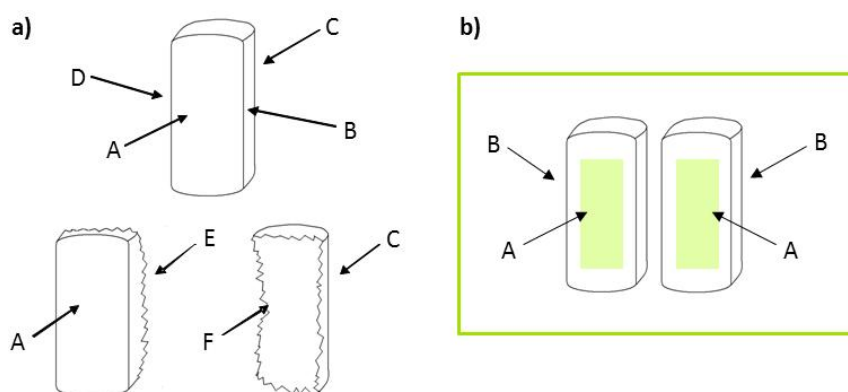
d'adquisició de les imatges es controla mitjançant el *software* Pixys® 1.1 *software* (Malvern Instruments, Malvern, UK).

Prèviament al registre de la mostra (S), es necessària l'adquisició de les imatges del *background* (B) (placa ceràmica de referència del 99% de reflectància) i de la *dark reference* (D) (mirall). Aquestes imatges B i D ens serviran per poder aplicar la correcció espectral sobre la mostra (S), és a dir, eliminar la part de l'espectre corresponent a la resposta de l'instrument (el que es coneix com *fer el blanc*). El valor de reflectància (R) s'aconsegueix aplicant l'equació:  $R = (S-D) / (B-D)$ . Aquest càlcul s'ha aplicat a tots els píxels de cadascuna de les imatges registrades.

### 3.3.2 Imatges registrades

S'han registrat sis imatges de cada nucli: quatre de cadascuna de les cares exteriors (A-D) i dues de les cares interiors (E-F) obtingudes per partició dels comprimits, tal com es mostra a la Figura 6a. En el cas de les mostres de producció s'han registrat només les quatre cares exteriors dels comprimits, anomenades de la mateixa manera que en els nuclis (A-D). Per a les mostres de comprimits del grup b, en canvi, s'han registrat dues imatges de cada comprimit, pertanyents a dues cares exteriors oposades. En aquest últim cas, cada imatge inclou dos cares homòlogues de dos comprimits d'iguals característiques (mateix gruix de laca), tal com es mostra a la Figura 6b. Aquestes imatges no han estat considerades en la seva totalitat, sinó que només s'han tingut en compte porcions rectangulars interiors de cada comprimit. Això s'ha fet per tal d'evitar les distorsions produïdes per la llum a les vores dels comprimits de la imatge.

Les imatges dels compostos purs en pols s'han obtingut posant la quantitat suficient dels mateixos en una cubeta de vidre, comprimint lleugerament la seva superfície i adquirint la imatge a continuació.



**Figura 6.** Esquema de les diferents cares d'anàlisi d'un comprimit: a) nuclis i comprimits lacats estàndard; b) comprimits amb diferents percentatges de recobriment, amb les àrees seleccionades per la determinació marcades en gris.

### 3.4 Tractament de les dades

Una vegada registrades les imatges NIR, les dades de reflectància ( $R$ ) de la imatge es transformen a unitats d'absorbància ( $A$ ), segons la fórmula  $A = \log 1/R$ . La conversió a unitats d'absorbància, així com el processament de les imatges i la selecció de la zona a analitzar s'han dut a terme mitjançant el *software* Isys 5.0 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

Tal com s'ha explicat en l'apartat 1.3.1, abans d'aplicar la majoria d'algoritmes quimiomètrics, cal desdoblar els cubs de dades 3D que suposa cadascuna de les imatges, per convertir-los en matrius bidimensionals. Aquestes transformacions no són necessàries quan es treballa amb el programa Isys 5.0, però sí per treballar amb MATLAB (MATLAB v 7.0, *The MatWorks*, Massachussetts) o Unscrambler 9.8. El desdoblament del cub de dades s'ha realitzat gràcies a rutines programades en codi MATLAB [20], per a les matrius de dades desdoblaes.

Un cop desdoblaes les matrius de dades, s'hi apliquen els pretractaments quimiomètrics necessaris, amb l'objectiu d'eliminar les contribucions espectrals no desitjades. En aquest treball, s'ha aplicat SNV (apartat 1.3.2), que permet disminuir efectes indesitjats que apareixen durant el registre de les imatges a causa de la geometria dels comprimits i la il·luminació de la mostra. Tots els pretractaments espectrals han estat aplicats mitjançant el programari esmentat anteriorment: Isys 5.0,

aplicat directament a les imatges hiperespectrals, i MATLAB per a les matrius de dades desdoblades.

Posteriorment, s'apliquen els algorismes quimiomètrics idonis per modelar les dades i extreure'n la informació d'interès.

A les matrius de dades sense desdoblar se'ls ha aplicat l'algoritme PLS (apartat 1.3.3) del programa Isys 5.0 per a la quantificació d'API i excipients. L'aplicació d'aquest algoritme només requereix l'adquisició prèvia d'una imatge NIR de cadascun dels components purs a determinar. Aquestes imatges s'utilitzen en la construcció de la biblioteca i del model PLS, ja que fan la funció de valors de referència: a cada imatge de la biblioteca se li associa el valor del 100% de concentració del component pur al qual correspon. El model PLS generat amb l'Isys 5.0 assignarà a cada imatge analitzada una matriu resposta segons la seva semblança espectral amb el component pur seleccionat de la biblioteca en cada cas. Les dades espectrals de la imatge es ponderen entre 0 i 1, on 0 correspon al 0% de concentració i 1, al 100%. El resultat final es presenta en forma de mapa de concentracions per a cada imatge i component [21].

El model s'acaba de definir amb l'elecció del nombre de factors i del *threshold* a aplicar. Un augment en el nombre de factors permet incrementar la variància (Y) explicada pel model, però, alhora, també incrementa les possibilitats de sobreajust, de manera que cal trobar un punt de compromís per aconseguir el model més simple, però amb bona capacitat predictiva. El *threshold* permet ajustar els límits de discriminació entre classes (components). L'elecció del *threshold* dependrà de la similitud entre l'espectre del component pur a quantificar i els espectres dels altres components purs, a més del nombre de factors escollit.

Per a la determinació del gruix del film de recobriment s'ha construït un model PLS amb el programa The Unscrambler v.9.8 de CAMO Process S.A. (Trondheim, Norway). En aquest cas, totes les imatges usades han estat prèviament desdoblades. Per a la construcció d'un model de regressió PLS amb l'Unscrambler és necessari disposar de conjunts de calibratge i validació compostos per mostres amb els corresponents valors de referència. Aquestes mostres han d'abastir tot el rang de la magnitud a quantificar i ser de la mateixa naturalesa que les mostres de predicció. El model es construeix amb les mostres de calibratge i es verifica mitjançant *cross-validation*. Abans d'obtenir el model definitiu, però, cal optimitzar el nombre de factors per tal d'aconseguir la màxima capacitat predictiva possible. Aquesta optimització s'ha dut a terme aplicant el

model generat a les mostres de validació i seguint els mateixos criteris que per als models PLS desenvolupats amb l'Isys (descrits anteriorment). A més, també s'han tingut en compte els valors obtinguts del *Root Mean Square Error of Prediction* (RMSEP) i el *Relative Standard Error of Prediction* (RSEP). El RMSEP i el RSEP són dos paràmetres que permeten calcular l'error de predicció (en forma d'error mig i error relatiu, respectivament) d'un model sobre les mostres del conjunt de validació. Aquests paràmetres s'han calculat mitjançant el programa Microsoft Office Excel 2003 de Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA), també usat en aquest treball pel càlcul dels coeficients de correlació entre espectres i l'elaboració de gràfics i taules.

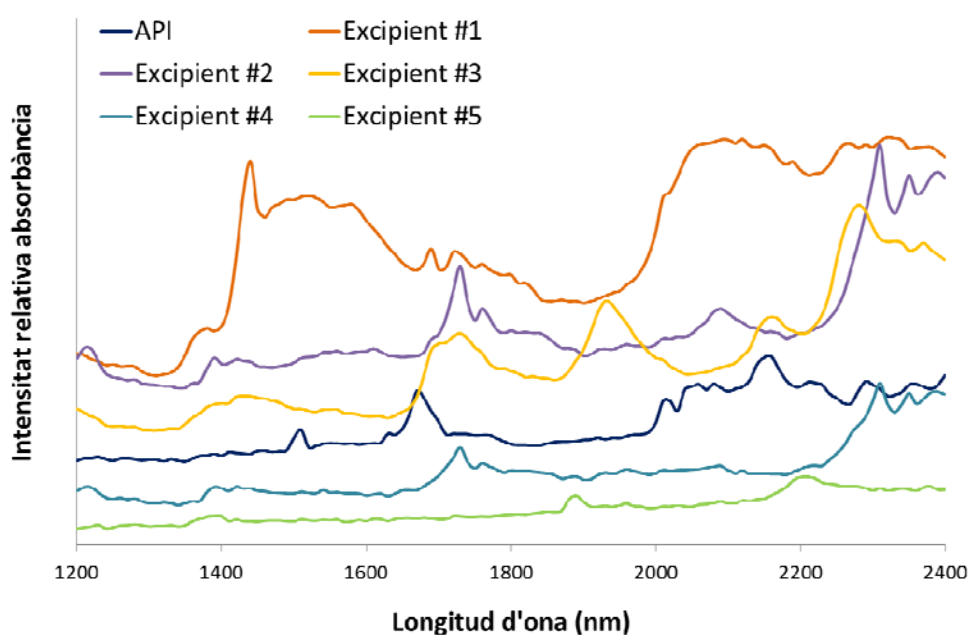
El resultat final, en aquest cas, es presenta en forma de columnes numèriques amb un valor de predicció per cada fila (píxel en la imatge original) de la imatge desdoblada. Aquests valors es poden reordenar (*re-folding*) mitjançant l'aplicació de rutines específiques programades en codi MATLAB [20], que permeten recol·locar cada píxel al seu lloc en la imatge original. Així s'aconsegueix la reconstrucció de la imatge original amb els valors de predicció per cada píxel, és a dir, el mapa de concentracions de la imatge.



## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest estudi es pretén establir un mètode quantitatiu per a la determinació de la concentració i distribució dels diferents components a la superfície d'un comprimit farmacèutic. Tot això es fa partint de dades obtingudes mitjançant NIR-CI. És per aquest motiu que el primer que s'ha fet és comparar els espectres NIR dels diferents components a analitzar, ja que són la base dels models a crear.

Al Gràfic 1 es mostren espectres dels components purs (l'API i els cinc excipients) dels comprimits estudiats. Els espectres s'han obtingut promitjant els espectres de cadascun dels píxels de les imatges hiperespectrals obtingudes pels components purs en pols. La comparativa dels espectres es recolza amb els coeficients de correlació espectral entre parells de components purs de la Taula 2. A simple vista destaca la similitud entre els espectres dels excipients #2 i #4, corroborada per un elevat coeficient de correlació (0.984). Aquesta semblança espectral, implicarà un major esforç a l'hora de desenvolupar els models de calibratge per a la quantificació d'aquests dos components. Pel que fa a la resta de components purs, les diferències entre espectres són més clares i els coeficients de correlació espectrals inferiors. Tot i això, en la Taula 2 hi han valors superiors al 0.8 de correlació espectral, el que complicarà la posterior discriminació entre components, sobretot si es tracta dels minoritaris (excipients #3, #4 i #5).

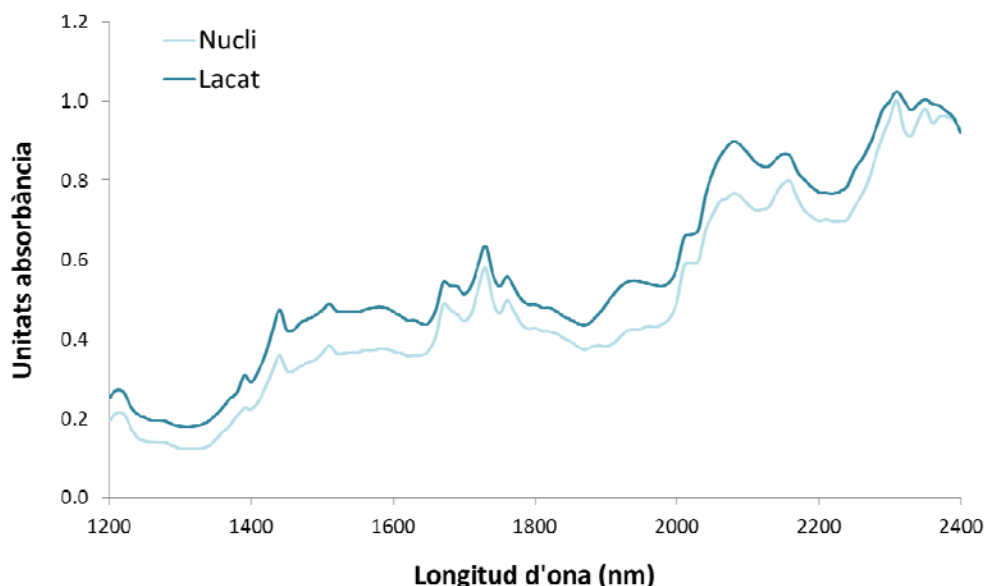


**Gràfic 1.** Espectres NIR de l'API i els diferents excipients purs.

**Taula 2.** Coeficients de correlació entre els espectres NIR dels diferents components purs dels comprimits (API i excipients).

Coeficients de correlació						
	API	E #1	E #2	E #3	E #4	E #5
API	1.000					
E #1	0.810	1.000				
E #2	0.621	0.601	1.000			
E #3	0.693	0.603	0.849	1.000		
E #4	0.640	0.588	0.984	0.903	1.000	
E #5	0.823	0.693	0.669	0.847	0.740	1.000

Un altre dels aspectes estudiats en el treball és el gruix i la distribució del recobriment del comprimits. És per això que al Gràfic 2 es comparen els espectres promig d'un nucli (0x) i un comprimit lacat (1x). S'observa com les diferències espectrals són mínimes, ja que la contribució espectral introduïda per la capa de lacat sol ser baixa. En aquest cas, la laca provoca un lleuger augment de la línia base de l'espectre mig, que és la diferència que s'aprofitarà l'hora de crear el model de calibratge.



**Gràfic 2.** Espectres NIR d'un nucli i un comprimit lacat. Els espectres NIR s'han obtingut a partir dels espectres de tots els píxels d'una imatge NIR.

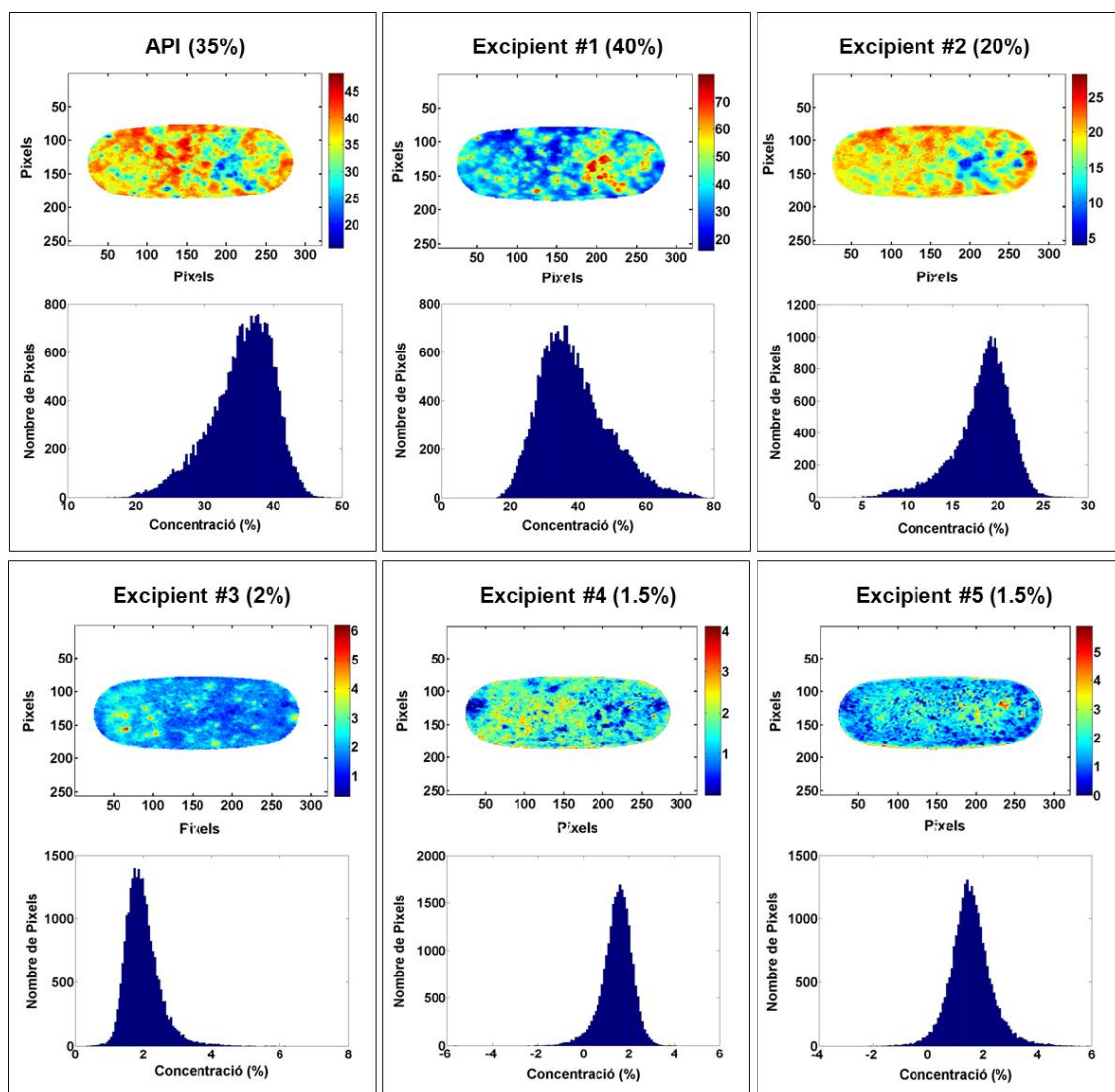
## 4.1 Quantificació d'API i excipients

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts per la quantificació d'API i excipients, tant en nuclis (comprimits sense recobrir), com en comprimits recoberts. La discussió es fa en dos apartats diferents, atenent a l'efecte que exerceix la laca que s'aplica com a recobriment dels comprimits analitzats sobre els espectres NIR. Aquest efecte s'haurà de tenir en compte a l'hora de generar els models, ja que la presència de laca pot afectar la quantificació de la resta de components del comprimit.

### 4.1.1 Nuclis

S'ha estudiat la construcció d'un model per a la determinació de la distribució i la concentració del principi actiu i dels cinc excipients que componen el nucli. S'ha creat una biblioteca amb les imatges NIR dels diferents components purs a quantificar (API i els cinc excipients) i, a continuació, s'ha aplicat l'algoritme PLS del programa Isys 5.0 per cadascun d'ells. En total s'han creat un total de sis models, amb un nombre de factors comprès entre 4 i 8 i un treshold d'entre el 70 i el 95%, segons l'analit a modelar.

A la Figura 7 es mostren els mapes de concentració dels diferents components per una de les cares exteriors d'un nucli, obtinguts amb els models PLS generats amb el programa Isys 5.0. Es pot veure que la distribució de l'excipient #2 i de l'API són molt similars, amb àrees de major concentració localitzades en les mateixes zones de la superfície del comprimit. Per contra, les àrees de major concentració de l'excipient #1 són complementàries a les de l'API. Aquesta distribució s'explica perquè l'API i l'excipient #2 es barregen en una primera etapa del procés de producció i posteriorment s'hi afegeix la resta d'excipients. Pel que fa als excipients minoritaris, la distribució és uniforme en tota la imatge. La distribució d'API i excipients observada per a la resta de cares del mateix nucli i per a altres nuclis analitzats no presenta diferències significatives respecte la cara descrita anteriorment i segueix les mateixes tendències que aquesta.



**Figura 7.** Mapes de concentració d'API i excipients per la cara A (exterior) d'un nucli, obtinguts mitjançant models de calibratge PLS (programa Isys 5.0) i els seus corresponents histogrames. Entre parèntesi s'indica la concentració nominal de cada component.

A la mateixa Figura 7 es mostren també els histogrames per cadascun dels components del nucli. Es tracta de gràfics on es representen tots els píxels d'una imatge ordenats segons la concentració que presenten del component analitzat en cada cas. Els histogrames permeten visualitzar de forma més clara la distribució de concentracions d'una imatge, ja que són un reflex directe de la homogeneïtat d'un component al llarg de la superfície del comprimit registrat. Per als excipients minoritaris, la distribució dels histogrames s'apropa a la normalitat, ja que aquests són bastant simètrics i amb bases estretes, el que redueix la importància de les petites heterogeneïtats observades en els mapes de concentració. En canvi, els histogrames per als excipients majoritaris s'allunyen de la normalitat, ja que presenten bases més

amples, fet indicatiu de la presència de zones del comprimit amb valors de concentració allunyades del valor nominal (central). Això implica també el desplaçament de les modes en sentit contrari. Els histogrames de l'API i l'excipient #2 presenten una forma molt similar, amb cues notables a l'esquerra, fet que implica abundància de píxels amb concentracions inferiors a les nominals i modes superiors. En canvi, les cues de l'histograma per l'excipient #1 són a la dreta, indicant un nombre més gran de píxels amb valors de concentració significativament superiors a les esperades i modes inferiors.

A la Taula 3 es mostren les concentracions mitges obtingudes per tots els analits per a cadascuna de les cares d'un nucli. En les cares exteriors (A-D) del nucli analitzat, la concentració predita pels models és propera al valor nominal, no només per a l'API i els excipients majoritaris, sinó també per als excipients minoritaris. No obstant això, es detecten petites diferències de composició a les cares interiors (E i F) del comprimit: les concentracions dels dos components majoritaris (API i excipient #1) mostren desviacions respecte els valors nominals i de la resta de les cares. S'observa un descens notable del contingut d'API i, en menor grau, del d'excipient #2 i un augment en el contingut d'excipient #1. Aquestes desviacions es reflecteixen en un augment en els valors de desviació estàndard per aquests tres components. Aquest comportament es repeteix en els diferents nuclis analitzats i pot ser explicat pel mateix procés de tall del comprimit. El tall pot desplaçar algun dels components, o bé, afectar l'adquisició de les imatges, degut a la rugositat de la superfície resultant del tall.

**Taula 3.** Concentracions (en % m/m) d'API i excipients de les diferents cares d'un mateix nucli calculades mitjançant models de calibratge PLS (Isys 5.0).

Composició dels nuclis (% m/m)							
	API	E #1	E #2	E #3	E #4	E #5	Suma
Cara A	35.51	38.93	20.15	1.97	1.48	1.47	99.51
Cara B	35.45	39.48	21.12	1.98	1.48	1.51	101.00
Cara C	37.11	38.45	19.69	1.99	1.53	1.53	100.30
Cara D	37.45	40.38	20.14	1.95	1.53	1.51	102.96
Cara E	31.61	44.16	18.62	1.95	1.48	1.51	99.38
Cara F	31.47	43.38	19.31	1.97	1.55	1.53	99.21
Mitja	34.78	40.79	19.84	1.97	1.51	1.51	100.40
Desv. Est.	2.62	2.41	0.85	0.02	0.03	0.02	5.95

Cal destacar que la suma dels percentatges de tots els components, s'aproxima al 100% en totes les cares, fet que demostra la correcta capacitat predictiva dels models de calibratge.

#### 4.1.2 Comprimits lacats

La determinació d'API i excipients també s'ha realitzat en els comprimits amb diferents gruixos de laca. S'ha aprofitat la mateixa biblioteca creada per a l'anàlisi dels nuclis (apartat 4.1.1) per construir els models de calibratge PLS (Isys 5.0) pels comprimits lacats i s'han construït models per a cadascun dels components dels comprimits (API i els cinc excipients). Tot i això, en el treball només s'inclouen els resultats dels models pels tres components majoritaris, ja que els minoritaris presenten desviacions importants respecte els valors de referència. Els models creats per als tres components majoritaris, tenen un nombre de factors que oscil·la entre 3 i 6 i un threshold d'entre el 60 i el 81%, depenent de l'analit a modelar i del gruix de recobriment de la mostra.

Els resultats obtinguts per a les dues cares, A i B, d'un mateix comprimit, però amb diferents gruixos de recobriment es mostren a la Taula 4. Cada resultat correspon a la mitjana dels valors de concentració obtinguts per als dos comprimits inclosos en una mateixa imatge (Figura 6b). Les concentracions predites disminueixen gradualment amb l'augment del gruix de laca tal com era d'esperar. Les prediccions obtingudes són properes als valors nominal (Taula 1) pels comprimits de fins un gruix de laca estàndard (1x). Però les desviacions respecte els valors de referència augmenten notablement en els comprimits amb més gruix de recobriment (2 i 3x) i, sobretot, en el cas de l'excipient #2, el menys abundant dels tres.

D'aquests resultats es pot concloure que les desviacions observades en els càlculs de concentració són degudes principalment al recobriment de laca, que afecta de manera important a la determinació de la concentració en el cas de components minoritaris i, en menor grau, a la dels components majoritaris.

**Taula 4.** Concentraciones (en % m/m) de l'API i els dos excipients majoritaris de comprimits amb diferents percentatges de recobriment, calculades mitjançant models de calibratge PLS (Isys 5.0).

Gruix de laca	Cara	Components (% m/m)		
		API	E #1	E #2
0x	A	35.25	40.74	20.20
	B	35.67	39.46	21.34
0.5x	A	35.85	40.30	19.67
	B	35.31	40.27	20.36
1x	A	34.56	40.80	20.79
	B	35.20	40.18	21.64
2x	A	33.15	39.15	17.95
	B	32.95	42.40	15.31
3x	A	30.85	38.51	12.65
	B	29.65	39.78	14.03

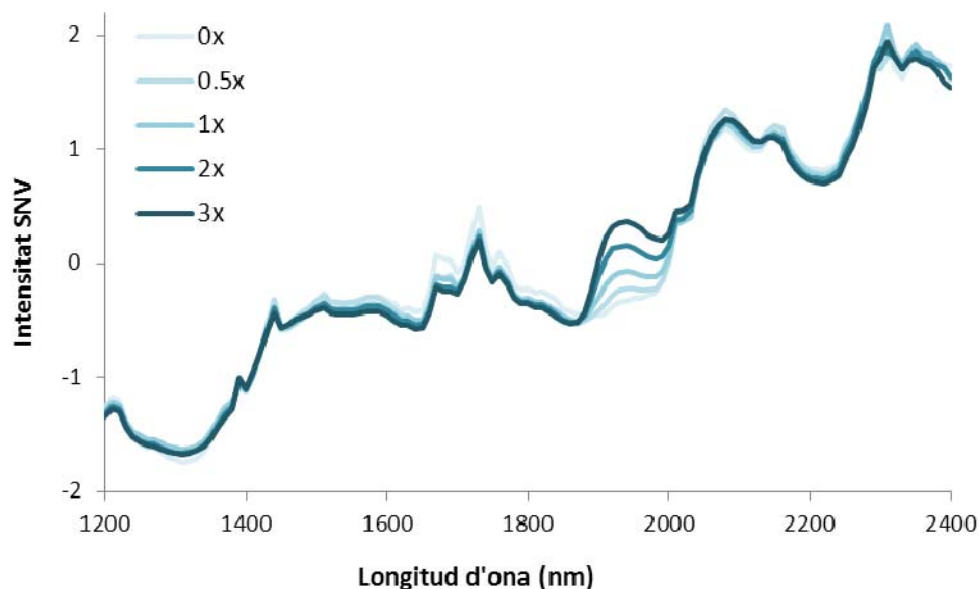
## 4.2 Quantificació del recobriment

El gruix i la homogeneïtat de la capa de laca afecten la integritat dels comprimits analitzats. A més, també afecten directament la qualitat de la quantificació dels diferents components del comprimit. És per això que és de vital importància poder determinar aquests paràmetres del recobriment en comprimits farmacèutics.

Per determinar el gruix de la capa de laca de recobriment s'ha construït un model de calibratge PLS amb el programa Uncrambler 9.8, utilitzant l'espectre promig de les imatges de les cares de cada comprimit enfront del temps de recobriment. Els espectres promig s'han aconseguit promitjant els espectres de cadascun dels píxels dels comprimits de les imatges. Es disposa de vint espectres, quatre per cada nivell de recobriment: 0x, 0.5x, 1x, 2x i 3x. D'aquests vint espectres, tres s'han descartat com a *outliers*, dotze han servit per construir el model de calibratge i els cinc restants, per validar-lo. La selecció dels *outliers* s'ha fet atenent a la distància de les mostres respecte la recta de regressió (mesura vs predicció) i a la magnitud dels residuals obtinguts.

Per a la construcció del model PLS amb l'Uncrambler 9.8, s'han assajat diversos pretractaments (SNV i 1a i 2a derivada de Savitzky-Golay) i s'han provat diferents

rangs espectrals. Pel que fa al pretractament, els millors resultats s'han obtingut amb SNV. Probablement, la raó es pot veure al Gràfic 3, on es comparen els espectres NIR promig de comprimits amb els diversos gruixos de recobriment assajats, tots pretractats amb SNV. S'observa com el SNV minimitza l'augment de la línia base provocat per la laca, realçant així les diferències entre comprimits. En el gràfic apareix un pic destacat a 1940nm on els espectres s'ordenen clarament segons el gruix de laca del comprimit del qual provenen: com major és el gruix de laca, més intensa és la seva absorbància a 1940nm. Amb aquest gràfic queda clar que la informació espectral referent al recobriment es troba a la zona dels 1940nm i que la resta de l'espectre no aporta gaires dades. Probablement, aquest sigui el motiu pel qual, les restriccions del rang espectral que s'han assajat no han aportat millores significatives al model.



**Gràfic 3.** Comparació dels espectres NIR de comprimits amb diferents nivells de lacat pretractats amb SNV. Els espectres NIR s'han obtingut a partir dels espectres de tots els píxels d'una imatge NIR.

Els millors resultats s'han obtingut pretractant les dades amb SNV i treballant amb el rang espectral complet. Així s'obté un model PLS (Unscrambler 9.8) que només necessita un factor per explicar el 99,31% de la variança. Aquest model és el que s'utilitza per determinar el gruix i la distribució del recobriment dels comprimits i les seves característiques es descriuen a la Taula 5.

A la Figura 8 es mostren els mapes de gruix de recobriment de les imatges de les quatre cares exteriors d'un mateix comprimit de producció (comprimit 1) a les quals se'ls ha aplicat el model PLS descrit anteriorment. Concretament, a les imatges es mostren només porcions de les cares del comprimit, que van des del 65 fins al 80% de



l'àrea total del comprimit. Aquesta selecció s'ha fet amb l'objectiu d'evitar les distorsions de la llum produïdes per la curvatura de les vores dels comprimits, però intentant englobar el màxim d'àrea possible en l'anàlisi.

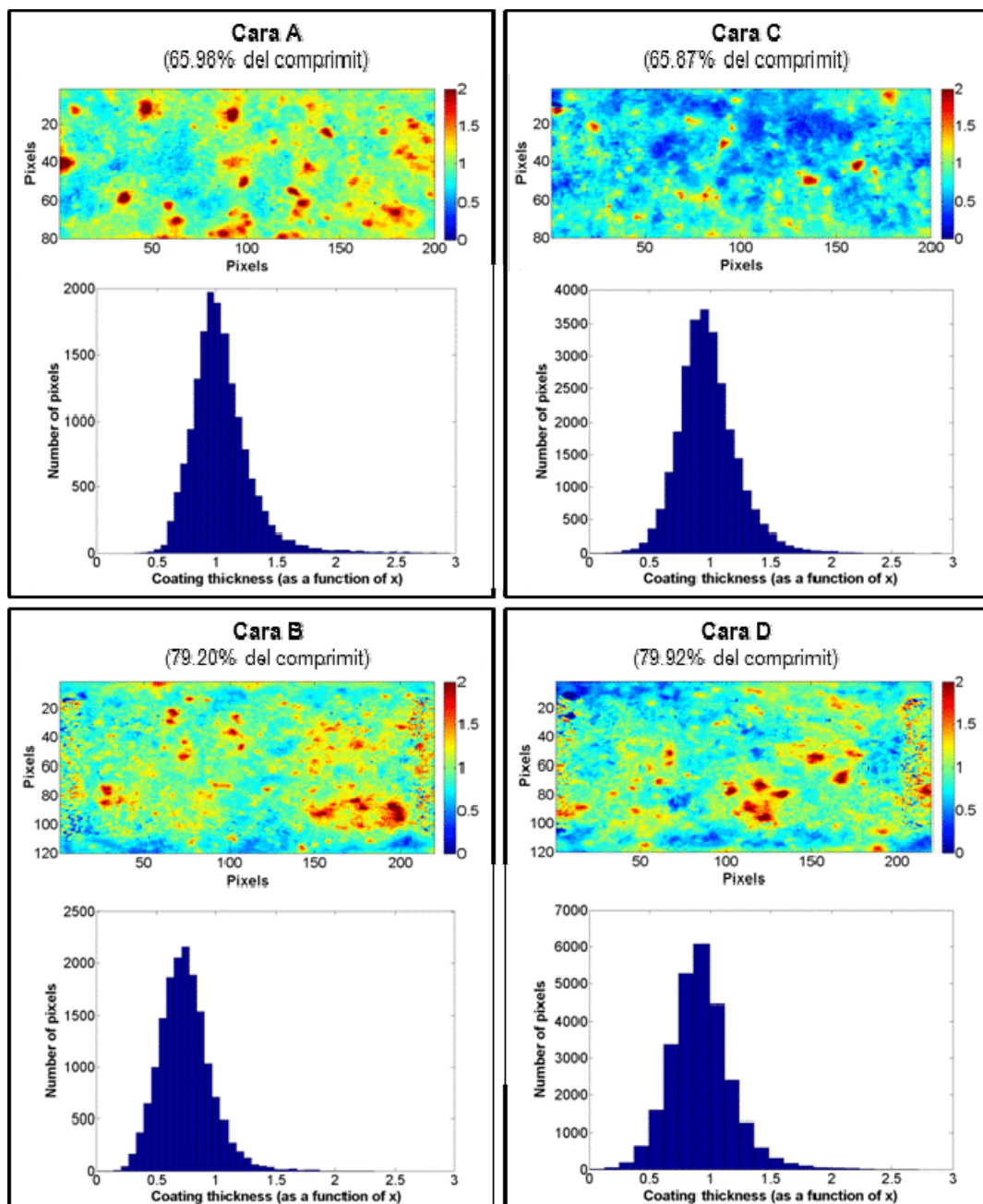
**Taula 5.** Característiques del model PLS Unscrambler 9.8) creat per la quantificació del recobriment.

Característiques del model de calibratge PLS	
Nombre de mostres incloses al model	12
Rang espectral (nm)	1200-2400
Pretractament espectral	SNV
Nº de factors	1
Variança-Y (%)	99.31
Nombre de mostres usades en la validació	5
RMSEP	14.04
RSEP (%)	8.32

De la comparació dels quatre mapes de concentració (tots en la mateixa escala), a simple vista es pot dir que el recobriment de la cara C és inferior al de la resta de cares del comprimit, donat el seu color més blavós. Aquest efecte es confirma amb els valors de gruix mig de recobriment predits pel mateix comprimit 1 (Taula 6). A la mateixa taula es mostren també els valors promig de recobriment per les quatre cares d'un altre comprimit de producció (comprimit 2), obtinguts mitjançant el mateix model PLS (Unscrambler 9.8). Tant per al comprimit 1, com per al 2, tractats i analitzats pel mateix procediment, s'observen diferències en el contingut de laca de les diferents cares de fins al 25% respecte el valor de referència. Tot i això, fent la mitjana dels valors de les quatre cares del comprimit, s'obtenen valors propers als nominals per a totes les mostres estudiades.

A banda d'això, analitzant cadascuna de les cares del comprimit de la Figura 8 individualment, s'observa l'existència d'alguns punts on la concentració predita és clarament superior a la resta de la superfície. Aquests punts poden ser deguts a la presència d'agregats de laca produïts en el mateix procés de recobriment del comprimit, ja sigui per deficiències en el sistema d'espraiat, que genera gotes de

tamany poc homogenis, o bé per problemes de col·lisió entre diferents comprimits abans d'assecar-se completament la capa de laca.



**Figura 8.** Mapes de concentració del recobriment per les quatre cares d'un comprimit de producció, obtinguts mitjançant el model de calibratge PLS (Unscrambler 9.8) i els seus histogrames corresponents. Entre parentesi s'indica el percentatge de analitzat respecte l'àrea total del comprimit.

A la mateixa Figura 8 es mostren també els histogrames de la distribució dels mapes de concentració. Tot i presentar bases amples amb petites cues a banda i banda en tots els casos, els gràfics s'acosten a la normalitat i mantenen la simetria. Això implica que, tot i que hi ha píxels amb valors allunyats del valor de gruix esperat,

la majoria s'aglutinen en valors propers a aquest (amb excepció de la cara C) i ho fan, tant per excès com per defecte.

**Taula 6.** Gruixos de recobriment (respecte el valor estàndard, x) per a les diferents cares de dos comprimits de producció (1 i 2), calculades mitjançant el model de calibratge PLS (Unscrambler 9.8) descrit.

Gruix de recobriment mig (respecte x)		
	Comprimet 1	Comprimet 2
Cara A	1.035	1.122
Cara B	0.984	1.177
Cara C	0.739	1.035
Cara D	0.925	1.223
Mitja	0.921	1.139

De tots aquests resultats es pot concloure que el gruix de recobriment no és del tot homogeni entre les diferents cares d'un mateix comprimit. Aquest fet podria veure's atenuat amb un canvi en el sistema d'agitació dels comprimits dins del tambor d'espraiat o amb l'aplicació de diversos pulveritzadors a diferents punts del tambor.

## 5. CONCLUSIONS

Gràcies als estudis realitzats es pot arribar a les següents conclusions:

- S'ha avaluat la capacitat de la tècnica NIR-CI i la seva aplicabilitat en els controls de qualitat de processos de producció de la indústria farmacèutica. La gran quantitat de dades que es recull en una sola imatge hiperespectral, juntament amb la rapidesa dels anàlisis i la fiabilitat en les prediccions fan del NIR-CI una tècnica molt adequada i amb un gran potencial pel monitoratge i control de comprimits farmacèutics al llarg de tot el procés de producció.
- S'ha estudiat la validesa de l'algoritme multivariant PLS (en les diferents versions dels *softwares* Isys 5.0 i Unscrambler 9.8) per extreure informació d'imatges NIR hiperespectrals. Es demostra la capacitat del PLS (Isys 5.0) per a l'obtenció d'informació de concentració i distribució de tots els components dels comprimits assajats. Així mateix, es demostra la capacitat del PLS (Unscrambler 9.8) per a l'anàlisi del gruix i la distribució de la capa en comprimits recoberts.
- S'ha comprovat la capacitat de predicció dels models PLS construïts amb l'anàlisi de noves mostres. Els resultats confirmen la validesa del PLS (Isys 5.0) per a la predicció quantitativa de la concentració i la distribució, tant dels components majoritaris, com dels minoritaris dels comprimits assajats. De la mateixa manera es confirma la validesa del PLS (Unscrambler 9.8) per a l'estimació del gruix i l'homogeneïtat de la capa de recobriment.
- Els resultats obtinguts demostren que aquesta tècnica, amb l'ajuda de les eines quimiomètriques adients, és adequada per a la determinació quantitativa de la concentració de cadascun dels components dels comprimits (amb i sense recobriment), l'anàlisi de la seva distribució en les capes superficials i la determinació del gruix i l'homogeneïtat de la capa de recobriment. Per tant, es tracta d'una tècnica adequada pel control dels processos d'homogeneïtzació i de distribució dels components de preparats farmacèutics, així com del procés de recobriment de comprimits.

---

## 6. BIBLIOGRAFIA

---

- [1] Guidance for Industry. PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Office of Regulatory Affairs (ORA). September 2004.
- [2] Siesler, H. W. "Basic Principles of Near-Infrared Spectroscopy". A: Burns, D.A., Ciurczak, E.W. (Eds) *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 3a ed. New York: CRC Press, 2008. (Practical spectroscopy series, 35. P. 7-19).
- [3] Reich, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005, 57, 1109-1143.
- [4] Peguero, A. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Maig 2010.
- [5] Blanco, M., Villaroya, I. Spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends Anal. Chem.* 2002, 21(4), 240-250.
- [6] Ravn, C. Tesis doctoral, University of Copenhagen, Gener 2009.
- [7] Harthcock, M.A., Atkin, S.C. Imaging with Functional Group Maps Using Infrared Microspectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 1988, 42(3), 449-455.
- [8] Lewis, E. N., Schoppelrei, J. W., Lee, E., Kidder L. H. "Near-Infrared Chemical Imaging as a Process Analytical Tool". A: Bakeev K. A. (Eds) *Process analytical Technology*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005.
- [9] Ma, H., Anderson, C. A. Characterization of Pharmaceutical Powder Blends by NIR Chemical Imaging. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97, 3305-20.
- [10] Li, W., Woldu, A., Kelly, R., McCool, J., Bruce, R., Rasmussen, H., Cunningham, J., Winstead, D. Measurement of drug agglomerates in powder blending simulation samples by near infrared chemical imaging. *Int. J. Pharm.* 2008, 350, 369-373.
- [11] Lopes M.B., Wolff J.C., Bioucas-Dias J.M., Figueiredo M.A., Determination of the composition of counterfeit Heptodin tablets by near infrared chemical imaging and classical least squares estimation. *Anal. Chim. Acta.* 2009, 641, 46-51.
- [12] Cruz, J., Bautista, M., Amigo, J. M., Blanco, M. Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets. *Talanta.* 2009, 80, 473-478.
- [13] Gendrin, C., Roggo, Y., Collet. C. Content uniformity of pharmaceutical solid dosage forms by near infrared hyperspectral imaging: A feasibility study. *Talanta.* 2007, 73, 733-741.
- [14] Lee, E., Huang, W. X., Chen, P., Lewis, E. N., Vivilecchia, V. High-throughput analysis of pharmaceutical tablet content uniformity by near-infrared chemical imaging. *Spectroscopy.* 2006, 21, 24-32.

- 
- [15] Gowen, A. A., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J., Bell, S. E. J. Recent applications of Chemical Imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007, 69, 10-22.
- [16] Cairós, C., Amigo, J.M., Watt, R., Coello, J., MasPOCH, S. Implementation of enhanced correlation maps in near infrared chemical images: Application in pharmaceutical research. *Talanta*. 2008, 79, 657-664.
- [17] Maurer, L., Leuenberger, H. Terahertz pulsed imaging and near infrared imaging to monitor the coating process of pharmaceutical tablets. *Int. J. Pharm.* 2009, 370, 8-16.
- [18] Roggo, Y., Chaluz, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C., Edmond, A., Jent, N. A review of near-infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 22, 683-700.
- [19] Ravn, C., Skibsted, E., Bro, R. Near-infrared chemical Imaging (NIR-CI) on pharmaceutical solid dosage forms—Comparing common calibration approaches. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 554-561.
- [20] José Manuel Amigo Personal Webpage. Rutines creades per José Manuel Amigo Rubio <<http://www.models.life.ku.dk/~jose/>> (Febrer 2010)
- [21] Puchert, T., Lochmann, D., Menezes, J.C., Reich, G. Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) for counterfeit drug identification—a four-stage concept with a novel approach of data processing. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 51, 138–145.